

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/529397
PCT/JP99/04399

13.08.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4399

REC'D 01 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 8月14日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第242596号

出願人
Applicant(s):

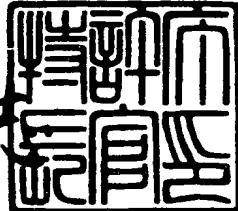
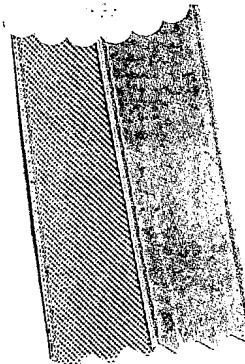
科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月 2日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建



出証番号 出証特平11-3061771

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PA906938
 【提出日】 平成10年 8月14日
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
 【国際特許分類】 C12N
 【発明の名称】 R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸
 【請求項の数】 21
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都文京区向丘1-20-6-607
 【氏名】 横山 茂之
 【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県朝霞市北原2-7-9-403
 【氏名】 平尾 一郎
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区千住緑町2-10-15-803
 【氏名】 坂本 健作
 【特許出願人】
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
 【代表者】 理事長 中村 守孝
 【代理人】
 【識別番号】 100102668
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐伯 憲生
 【電話番号】 03-5205-2521
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 039251
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 R a s の標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸。

【請求項 2】 核酸が R N A である請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】 核酸が、 R a s の標的蛋白質の R a s 結合ドメインに特異的に結合する請求項 1 又は 2 に記載の核酸。

【請求項 4】 R a s の標的蛋白質が、 R a f - 1 である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸。

【請求項 5】 配列表の配列番号 1 ~ 2 4 のいずれかひとつの塩基配列を有する R N A 。

【請求項 6】 R N A が、 配列表の配列番号 1 ~ 8 のいずれかひとつの塩基配列を有する R N A である請求項 5 に記載の R N A 。

【請求項 7】 配列表の配列番号 2 5 ~ 4 8 のいずれかひとつの塩基配列を有する R N A 。

【請求項 8】 R N A が、 配列表の配列番号 2 5 ~ 3 2 のいずれかひとつの塩基配列を有する R N A である請求項 7 に記載の R N A 。

【請求項 9】 R a f - 1 への特異的な結合能を有する請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の R N A 。

【請求項 10】 R a f - 1 の R a s 結合ドメイン (R B D) へ特異的に結合する R N A である請求項 9 に記載の R N A 。

【請求項 11】 配列表の配列番号 1 ~ 4 8 のいずれかひとつの塩基配列又はそのうちの 1 個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは 1 個以上の塩基が付加されてなる請求項 9 又は 10 に記載の R N A 。

【請求項 12】 請求項 5 ~ 1 1 のいずれかに記載の R N A と相補的な塩基配列を有する D N A 。

【請求項 13】 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の核酸からなる細胞のシグナル伝達の制御剤。

【請求項 14】 核酸が R N A である請求項 1 3 に記載の制御剤。

【請求項15】 請求項1～12のいずれかに記載の核酸を使用する細胞のシグナル伝達を制御する方法。

【請求項16】 核酸がRNAである請求項15に記載の方法。

【請求項17】 請求項1～12のいずれかに記載の核酸を含有してなる医薬組成物。

【請求項18】 癌又は炎症の治療のための請求項17に記載の医薬組成物

【請求項19】 種々の塩基配列を有するRNAのプールから、Rasの標的蛋白質への結合能を有するRNAをセレクションすることからなる、Rasの標的蛋白質への特異的な結合能を有するRNAを選別する方法。

【請求項20】 種々の塩基配列を有するRNAのプールのRNAが、20～300の塩基からなるRNAである請求項19に記載の方法。

【請求項21】 Rasの標的蛋白質が、Raf-1である請求項19又は20に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Rasの標的蛋白質に特異的に結合する新規な核酸（アプタマー）に関する。より好ましくは、本発明は、Raf-1に特異的に結合する新規なRNAアプタマーに関する。また、本発明は、本発明の核酸を使用する細胞の増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御、及び、これを用いた医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

Rasはグアニンヌクレオチド結合タンパクであり、細胞のシグナル伝達に関与している蛋白質である。細胞のレセプターが活性化されると、細胞内のRas蛋白質にGDPが結合して、「GDP結合型Ras」となる。形成された「GDP結合型Ras」はさらにリン酸化されて、「GTP結合型Ras」になる。

この「GTP結合型Ras」は、Raf-1、B-Raf、RGL、Ral

GDS、MEKK、P13KなどのRasの標的蛋白質に結合して、必要なシグナルを細胞内に伝達してゆく。

【0003】

これらのRasの標的蛋白質には、GTP結合型Rasが結合し得るRas結合ドメインがあり、GTP結合型Rasはこのドメインに結合することにより細胞内にシグナルを伝達してゆく。

このようにRasは、細胞内のシグナル伝達のキーとなる蛋白質であり、Raf-1などの「Rasの標的蛋白質」は、Rasからのシグナルをその種類に応じて伝達してゆく細胞内シグナル伝達系の中核となるものである。

【0004】

したがって、「Rasの標的蛋白質」におけるGTP結合型Rasとの結合ドメインを特異的にブロックし得る物質があれば、細胞内のRasによるシグナル伝達系を特異的に阻害することが可能となり、当該シグナル伝達に起因する各種疾患の治療や予防に有用になる。例えば、がん細胞においては、「Rasの標的蛋白質」による増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御を特異的に阻害することより、がん細胞の増殖や分化を停止させて、がんの治療や転移を防止することができるようになる。

【0005】

ところで、「Rasの標的蛋白質」のひとつであるRaf-1は、細胞質に存在するセリン／スレオニンプロテインキナーゼであり、GTP結合型Rasと結合することにより活性が誘導される。活性化されたRaf-1は、マイトージェン活性化蛋白キナーゼ (mitogen-activated protein kinases) のファミリーのひとつであるMARK／ERKキナーゼ (MEKs) を活性化し、これをホスホリレート エクストラセルラー シグナルーレギュレティッド キナーゼ (phosphorylates extracellular signal-regulated kinases) に転換し、細胞内のシグナル伝達系に関与している（文献1、2）。

【0006】

このようなRaf-1の細胞内のシグナル伝達系を解明するために、Ras又はRaf-1の機能を選択的に阻害する方法が利用されてきた（文献15）。こ

これらの研究には、キナーゼ活性を有しないRaf-1変異体によるRas機能の阻害や（文献16）、Raf-1のキナーゼドメインに結合する抗体によるRaf-1キナーゼの阻害（文献17）などが含まれている。

【0007】

しかしながら、これらの阻害作用は、RasやRaf-1によるシグナル伝達系の特定の一部を特異的に阻害するものではなく、Rasとの結合機能やキナーゼ機能などの多数の機能を同時に多面的に阻害することから、阻害されるシグナル伝達系を特定することはできず、シグナル伝達系の個々の特定のメカニズムを充分に解明することはできなかった。

したがって、Raf-1へのRasの結合を特異的に阻害し得る分子種の開発が、シグナル伝達系の役割を解明してゆくために重要となってきている。

【0008】

現在のところ、Rasの下流のシグナル伝達経路は完全には解明されてはいないが、このような分子種が開発されれば、特定の一部の経路を特異的に阻害することができる分子種を用いることによって、Rasが関わるシグナル伝達の経路を解明し、Rasの標的蛋白質によるシグナル伝達経路を詳細に解明することができるばかりでなく、細胞内でのシグナルの伝達を制御することができることになり、腫瘍などの細胞内のシグナル伝達に関与している各種疾患の治療、予防が可能となる。

【0009】

一方、このようなRasが関わる細胞内のシグナル伝達の経路の中の「Rasの標的蛋白質」の構造解析も行われてきており、そのひとつであるRaf-1のRas結合ドメイン（RBD）は、Raf-1のN末端からの51-131位であることが知られてきている（文献6、18）。

【0010】

また、非核酸分子種に結合する蛋白質などのある種のターゲットに対して、高親和性を有するRNA又はDNAなどの核酸分子種（アプタマー類）が、「インビトロセレクション」（*in vitro selection*）法（文献、22、23）により単離されてきている（文献19、20、21）。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Raf-1、B-Raf、RGL、Ral GDS、MEKK、P13Kなどの「Rasの標的蛋白質」のRas結合ドメイン（RBD）に特異的に結合して、「GTP結合型Ras」との結合を特異的に阻害することができる核酸分子種を提供するものである。

【0012】

本発明者らは、インビトロセレクション（In vitro selection）法を用いることにより、「Rasの標的蛋白質」のRas結合ドメインに特異的に結合する核酸分子種を得ることができることを見出した。例えば、この手法により「Rasの標的蛋白質」のひとつであるRaf-1のRas結合ドメイン（RBD）をターゲットとした新規なRNAアプタマーを得、そのRNA配列を決定することができた。このRNAアプタマーは、RasとRaf-1の結合を特異的に阻害することができる。

【0013】

本発明は、「Rasの標的蛋白質」、特にそのRBDに特異的に結合する新規なRNAアプタマー、および、当該RNAアプタマーを用いたシグナル伝達系の制御方法を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、Ras蛋白質とRasの標的蛋白質が関与する細胞のシグナル伝達系を特異的に制御するための核酸を提供するものである。

本発明は、Rasの標的蛋白質に結合し得る核酸、好ましくはRNAに関する。より詳細には、本発明は、Rasの標的蛋白質のRas結合ドメインに特異的に結合し得る核酸、好ましくはRNAに関する。さらに詳細には、本発明は、Rasの標的蛋白質が、Raf-1である、Rasの標的蛋白質に結合し得る核酸、好ましくはRNAに関する。

【0015】

また、本発明は、配列表の配列番号1～24、好ましくは配列番号1～8のい

すれかひとつの塩基配列を有するRNAに関する。本発明は、配列表の配列番号25~48、好ましくは配列番号25~32のいずれかひとつの塩基配列を有するRNAにも関する。

本発明の前記配列番号で示されるRNAは、Raf-1への結合能を有するものであり、より詳細にはRaf-1のRas結合ドメイン(RBD)に特異的に結合することを特徴とするものである。

【0016】

したがって、本発明は、配列表の配列番号1~48のいずれかひとつの塩基配列、又は、そのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは1個以上の塩基が付加されてなる、Raf-1への結合能を有することを特徴とするRNAに関する。

本発明のこれらのRNAは、必要により逆転写して、前記したRNAと相補的な塩基配列を有するDNAとすることもできる。したがって、本発明は、配列表の配列番号1~48のいずれかひとつの塩基配列、又は、そのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を有するRNA又はDNAなどの核酸類に関する。

【0017】

さらに、本発明は、前記したRNAからなる細胞のシグナル伝達の制御剤、又は、これらのRNAを用いた細胞のシグナル伝達を制御する方法に関する。

また、本発明は、前記したRNAを含有してなる医薬組成物、より詳細には細胞のシグナル伝達系が関与する疾患、例えば、癌又は炎症の治療、予防のための医薬組成物に関する。

【0018】

本発明の「Rasの標的蛋白質」とは、細胞のシグナル伝達に関与しているRas蛋白質、好ましくはGTP結合型Ras蛋白質と結合して細胞内のシグナル伝達系を形成する一群の蛋白質をいう。本発明の「Rasの標的蛋白質」としては、例えば、Raf-1、B-Raf、RGL、Ral GDS、MEKK、P13Kなどが挙げられるがこれに限定されるものではない。本発明の好ましい「Rasの標的蛋白質」としてはRaf-1などが挙げられる。

【0019】

本発明は、前記した「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合し得る核酸分子種が存在することを明らかにしたものであり、したがって、本発明の「Rasの標的蛋白質」と特異的に結合する核酸としては、RNAであってもDNAであってもよく、これらのRNA又はDNAが「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合するものであれば特に制限はない。また、本発明の核酸は、ひとつの「Rasの標的蛋白質」にのみ特異的に結合するものであってもよいが、2種以上の「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合するものであってもよい。

【0020】

本発明の核酸の長さは、「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合できるに充分な長さを有するものであれば特に制限はないが、20~300塩基、好ましくは20~150塩基、より好ましくは30~150塩基、さらに好ましくは30~100塩基のものがよい。結合の特異性を強調する場合には、長いものが好ましいが、合成方法などの入手手段の簡便性からは短いものが好ましい。

【0021】

本発明における「アプタマー」とは、蛋白質の特定のドメインに結合し得る核酸分子種のことをいい、当該核酸としてはRNAでもDNAでもよい。RNAからなるアプタマーを「RNAアプタマー」という。

【0022】

本発明の核酸（アプタマー）は、種々の方法で製造することができる。アプタマーの塩基配列がわかっている場合には、これを合成することもできる。

【0023】

本発明のアプタマーの配列がわからない場合には、公知の「インビトロセレクション」(in vitro selection)法(文献、22、23)によりアプタマーを選別していくことができる。本発明における「インビトロセレクション」法を説明する。

【0024】

まず、20~300塩基、好ましくは30~100塩基、より好ましくは30~70塩基のランダムな塩基配列のRNA類を調製する。これらのRNAはラン

ダムな配列を含む合成DNAから転写反応によって調製される。

このランダムな配列を有するDNA類の5'端及び3'端に、PCR法におけるプライマーとなるべき塩基配列をつける。この場合のプライマーとしては、特に制限はないが、後にこのプライマー部分を切断できるように制限酵素による切断配列を有するものが好ましい。プライマーとなる部分の長さにも特に制限はないが、約20~50塩基、好ましくは20~30塩基程度である。

また、5'端のプライマーには、T7RNAポリメラーゼのプロモーター配列を加えて、DNAからRNAへの転写反応を可能にする。

【0025】

このようにして両端にプライマーとしての塩基配列を有し、中央部にランダムな塩基配列を有するRNA群（RNAプール）をDNAから転写反応によって調製する。

次いで、このRNAプール中のRNAと、「Rasの標的蛋白質」、例えば、Raf-1、又は、その結合ドメインからなるペプチドを接触させて、「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAを分離する。得られたRNAを逆転写してcDNAとし、前記のプライマーを用いてPCR法により増幅する。増幅されたDNAを転写してRNAとし、これを前記したRNAプールへ戻す。

【0026】

以上の、RNAプール中での「Rasの標的蛋白質」との接触、結合したRNAの分離、逆転写、PCR法による増幅、及び、増幅されたRNAの元のRNAプールへの注入からなるサイクルを「ラウンド」と称する。即ち、1ラウンドとは前記のラウンドを1回行うことをいう。

【0027】

RNAプールを用いた前記したラウンドを行うと、RNAプール中の「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAの量が増加し、しかも特異的に結合する塩基配列を有するRNAの量が増加してくるので、ラウンド繰り返し行うことによりより特異的に結合するRNAを選別することができるようになる。

このようなラウンドは、5~50ラウンド、好ましくは5~30ラウンド行われる。

【0028】

前記した「インビトロセレクション」法により選別されてきたRNAは、常法によりその塩基配列を決定し、常法により逆転写してcDNAとすることもできる。また、必要により前記したプライマーとして使用された部分を切断することもできる。

このようにして、本発明のアプタマーを得ることもできる。

【0029】

本発明の「インビトロセレクション」法を、「Rasの標的蛋白質」としてRaf-1を例にしてより具体的に詳細に説明する。

【0030】

本発明者らは、Raf-1のRas結合ドメイン(RBD)に結合するRNA類を選定するために、ランダムな約60塩基からなるRNAのプールを用意した。そして、これらの約60塩基からなるRNAの3'一末端及び5'一末端には図1に示される塩基配列を結合させた。

【0031】

このRNAプールには、約 8×10^{13} 種のRNAが存在していると推定された。

アプタマーのセレクションを行う前に、このRNAプールとRaf-1-RBDの結合に対する塩濃度の効果を調べた。低塩濃度下ではRNAがRaf-1-RBDに非特異的に結合してしまったが、塩濃度を高くすることによって(150mM程度まで)、この非特異的な結合が抑えられることがわかった。そこで、本発明者らは、セレクションのための緩衝溶液として、137mMの食塩を含むリン酸緩衝液(以下、「結合バッファー」という。)を使用することにした。

【0032】

最初から13ラウンドまでのセレクションは、グルタチオンーセファロース4Bマトリックスを用いて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)とRaf-1の51~131までのペプチド(RBD)との融合蛋白質(以下、「GST-RBD」という。)とRNA類との結合により行われた。この13ラウンドで、RNAプールとの結合能(binding ratio)は、当初の0.16%から

0. 36%にわずか上昇した。

これに引き続いて、前記のマトリックスに代えてニトロセルロースフィルターを用いたセレクションを8回（8ラウンド）行った。21回目のラウンドにおいて、RNAプールの結合能は22%を示し、蛋白質GST-RBDに対するプールのKd値は290nMとなった。

【0033】

21ラウンドを終えたRNAプールから33個のクローンの配列を決定した。その結果、24種類の異なる配列が得られた。この24種の配列を図2に示す。大別して、その配列どうしに高いホモジニーを有するクローン（このグループを「グループ1」という。）とその他の互いにホモジニーが認められないクローン（これらを「グループ2」とする。）に分けられた。

グループ1の8種類のRNA（21.01～21.08）の全長（約100塩基）の配列を配列番号1～8に示す。

【0034】

これらのうちの10種のRNAとGST-RBDとの相互作用を、ニトロセルロースフィルターを用いた結合アッセイにより検討した（図2参照）。

グループ1のRNAはGST-RBDと充分な結合を示したのに対して、グループ2のRNAは充分な結合を示さなかった。配列番号1（図2の21.01）及び配列番号7（図2の21.07）に示されるRNAのKd値は両者共300nMであったのに対して、配列番号11（図2の21.11）のRNAのそれはマイクロモル単位であった（図3参照）。

図3は、配列番号1（黒丸印）、7（黒四角印）、及び、11（黒三角印）のRNAを種々の濃度（nM）で使用した場合のGST-RBDへの結合のペーセントを示している。

【0035】

さらに、これらのRNAリガンドは、GSTそれ自身には結合しなかった。このことは、これらのRNAはGST部分よりもGST-RBDのRBD部分に結合するものであることを示している。

【0036】

次に、前記のグループ1のRNAアプタマーがRasとRBDの相互作用を阻害するか否かを検討した（図4参照）。配列番号1（図4のA）、7（図4のB）、11（図4のC）、及び12（図4のD）（図2中の21.01、21.07、21.11及び21.12）の各々のRNAを0から12.5 μMの濃度で試験した。セファロースマトリックスに担持されたGST-RBDと、GTPγS又はGDP中のRasと共にインキュベートした。これらのRNAが存在する場合（図4中の各レーン3、4及び5。レーン3はRNA 20 pmol、レーン4はRNA 200 pmol、レーン5はRNA 2000 pmol。）とRNAが存在しない場合（図4中の各レーン1及び2。レーン1はGDPの存在下で、レーン2～5はGTP存在下である。）における、GST-RBDとRasとの結合を抗Ras抗体RAS004によるイミュノプロッティングにより検出した。

図4中の「Ras」は、RasとGST-RBDの結合したものとし、「GST-RBD」はGST-RBDが単独で存在していることをバックグラウンドとして示している。

【0037】

前述したようにGST-RBDとほとんど結合しない配列番号12のRNAは、濃度を12.5 μMしてもGST-RBDへのRasの結合を阻害しなかった。kd値がマイクロモル単位であった配列番号11のRNAも同様であった。

【0038】

これに対して、グループ1の中の配列番号1及び7のRNAは、RasとRBDの相互作用を効果的に阻害した。このことは、これらのRNAがRBDへ結合したためと考えられる。そして、GTP結合型のRasとRaf-1のRBDとのkd値は18 nM（文献30）であり、配列番号1及び7のRNAはその10倍も結合能が低いにもかかわらず、これらのRNAはRasとRaf-1との相互作用を阻害する。

【0039】

これらのRNAは、Rasやセファロースマトリックスに対しては親和性を有していないのであるから、これらのRNAがRasやセファロースマトリックスに結合して、マトリックス上のGST-RBDとRasとの結合を阻害するとい

う可能性はない。以上のことから、これらのRNAアプタマーのRBDに対する特異性が示された。

【0040】

キナーゼ活性を有しないRaf-1変異体やRaf-1のキナーゼドメインに結合する抗体が、細胞のシグナル伝達系におけるRasやRaf-1の役割を研究するために使用されてきた（文献16、17）。

キナーゼ活性を有さずにRasに結合し得るRaf-1変異体は、Ras依存のRaf-1活性を阻害するのみならず、Rasを含む広範囲なシグナル伝達系をブロックする。これは、この変異体がRaf-1の結合を阻害するのと同様に、GTP結合型Rasの種々の下流のエフェクターへも影響を与えるからである。

【0041】

同様に、Raf-1のキナーゼドメインのエピトープに結合するモノクローナル抗体は、Raf-1含む全てのシグナル伝達系を阻害する。これは、Raf-1は、GTP結合型のRasによって活性化されるのみならず、Rasとは無関係な経路によって活性化されるからである（文献17）。

【0042】

このような観点からみても、本発明のRBDに対するRNAアプタマーは、RasやRaf-1のキナーゼ活性に何等の影響を与えることなく、RasとRaf-1との結合を特異的に阻害できるものであるといえる。

さらに、本発明のRNAアプタマーは細胞内において発現させることができあり（文献31）、広範囲な分野に適用可能なものである。例えば、ヒトの病気の治療の場合には、炎症の治療（文献32）や、肺炎のRNA治療（文献33）などに適用できる。

【0043】

このように、本発明のRNAアプタマーは、「Rasの標的蛋白質」、より好ましくはRaf-1のRBDを特異的にブロックするものであり、細胞内のシグナル伝達を制御剤として使用できるのみならず、シグナル伝達系が関与する各種の疾患の治療、予防又は診断の分野への適用に特に適しているものである。

【0044】

本発明の核酸類を細胞のシグナル伝達系の制御に使用する場合には、本発明の核酸と直接目的とする細胞へ導入してもよいが、これをウイルスなどに組み込んで細胞に導入することもできる。

また、RNAを直接導入するのではなく、DNAの形で導入することもできる

。

【0045】

本発明の核酸を医薬組成物として使用する場合には、これをこのまま非経口投与することもできるが、ウイルスやDNAの形で各種ベクターに組み込んで投与することもできる。これらの投与形態においては、製薬上許容される担体を用いて医薬組成物とすることもできる。

本発明の医薬組成物は、細胞のシグナル伝達系に関与する各種疾患、特に悪性腫瘍や炎症の治療、予防又は診断に有用である。

【0046】

【実施例】

以下に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0047】

実施例1（蛋白質の精製）

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)並びにRBD(Raf-1の51-131アミノ酸部分)とGSTとの融合タンパク質（以下、GST-RBDという。）と、各々大腸菌株BL21、BL21DE3より発現させ、グルタチオンーセファロース4B(アメルシャム ファーマシア バイオテク社製)及びHQプロス(ペーセプティブ)のカラムを用いてクロマトグラフィーにより精製した(文献24)。

【0048】

野生型Ha-Ras蛋白は、大腸菌株BL21から得られたものを、DEAE-セファセル、セファデックスG-75及びリソースQ FPLC(アメルシャム ファーマシア バイオテク社製)のカラムクロマトグラフィーにて精製した(

文献24、25、26)。

これらの蛋白質の純度は、クマシーブルー及び／又は銀、染色によるSDS-PAGEで確認した。精製された蛋白は、-30℃で50%グリセロース中で保存された。

【0049】

実施例2（インビトロセレクション）

ランダムな60塩基を含むDNAのプールを調製した。これらのDNAはその両端に5' -GCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG AGATCAGAACAAACGCTCAA-3'、及び、5' -CGCCCT GCAGGGGCCTCATGTCGAA-3'の配列をインビトロでの転写およびPCRによる増幅のために有している。

75℃で3分間加温され、その後氷冷されたこれらのRNA類は、GST-RBD及びグルタチオンーセファロース4Bビーズを含有する結合バッファー(5mM MgCl₂含有リン酸緩衝生理食塩水)中で4℃で1時間インキュベートされた。GST-RBDが結合したRNA類をグルタチオンーセファロースビーズにより回収した。ビーズを洗浄バッファー(20mM トリス-HCl pH 7.5、5mM MgCl₂及び150mM NaCl)で洗浄し、ビーズ上のRNA類を沸騰水で溶出した。

【0050】

第1ラウンドから第13ラウンドまではこの手順を行った。但し、GST及び／又はビーズのみに結合しているRNA類を除去するために、GST-RBDとのインキュベーションの前(第3ラウンドから第13ラウンド)及び溶出の後(第7ラウンドから第13ラウンド)に、RNA類をGSTのみを担持しているグルタチオンーセファロースビーズに通した。

溶出物を逆転写し、PCRで増幅した。次のラウンドのRNAプールを、増幅されたcDNAからのインビトロでの転写により調製した。セレクションの第13ラウンド以降は、フィルター結合法により行った。RNAプール(75℃で3分間加温し、室温まで冷却した。)及びGST-RBDを、37℃で1時間結合バッファー中でインキュベーションした。GST-RBDと結合したRNA類を

ニトロセルロースフィルターに結合させて分離し、RNA類を7M尿素を含むバッファーで溶出した（文献27）。フィルターに結合しているRNA類を除くために、増幅の前にRNA類をフィルターに通した。

【0051】

実施例3（ニトロセルロース フィルター 結合アッセイ）

RNA類を、 $[\alpha-^{32}\text{P}] \text{UTP}$ を用いてT7RNAによりインビトロで転写した。RNA ($0.8 \mu\text{M}$) 及びその蛋白質とを、 37°C で1時間、 $50 \mu\text{l}$ の結合バッファー中でインキュベートした。その溶液の一部 ($50 \mu\text{l}$) をフィルター上に移し、 $200 \mu\text{l}$ の洗浄バッファーで3回洗浄した。

【0052】

解離定数を決定するために、 1.6nM の5' -末端が $[\gamma-^{32}\text{P}] \text{ATP}$ でラベルされたRNA及び種々の濃度のGST-RBDとをインキュベートした。フィルター上の放射線量を、富士BAS2500バイオイメージングアナライザーを用いて測定した。

【0053】

実施例4（阻害活性）

0.05%トリトンX-100を含有する結合バッファー $160 \mu\text{l}$ 中のGST-RBD $1 \mu\text{g}$ を、リン酸緩衝生理食塩水中のグルタチオンーセファロースビーズ懸濁液 $10 \mu\text{l}$ に混合した。混合物を 4°C で30分間インキュベートした。軽く遠心分離した後、上澄み液を捨てた。残ったビーズへ、40ngのRas（このものは、GTPγS又はGDPで結合化されていることは文献記載のとおりである（文献3）。）、及び、 $160 \mu\text{l}$ のRNAを含む結合バッファー溶液が加えられ、 4°C で30分間インキュベートした。インキュベーションの後、ビーズを $500 \mu\text{l}$ の洗浄バッファーで洗浄した。結合した蛋白質をLaemmliのバッファー（Laemmli's buffer）を用いた脱結合によりビーズから溶出させ、15%SDS-PAGEに展開した。抗Ras抗体RAS004（文献4）を用いてイミュノプロットし、これをECL免疫検出装置（アメルシャムファーマシアバイオテク社製）により視覚化した。

【0054】

【発明の効果】

本発明は、Raf-1などのRasの標的蛋白質に特異的に結合し、さらにはRasとの結合を阻害するRNAが得られたことであり、これらのRNAを用いた細胞内のシグナル伝達経路の特異的阻害方法を提供するものである。本発明により、細胞の特定の経路によりシグナル伝達経路を解明することが出来るのみならず、副作用の少ない医薬組成物を提供することが出来る。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Nucleic acid which may bind specifically to proteins being
effectors for Ras

<130> PA906938

<160> 52

<210> 1

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 1

cugaucaaug gcguaacaaug gauucguucu cauaacccaaa acccuuaccc cuuggacuga 60

<210> 2

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 2

cugaucaaug guguacaaug gauucguucu cauaacccaaa acccuaaccc cuggacuga 59

<210> 3

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 3

cugaucaaug guguacaaug gauucguucu cauaacccaaa acccuaaccc cuuggacugc 60

<210> 4

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 4

cugaucaaug guguacaaug gauucgcucu cauaacccaaa acccuaaccc cuuggacugc 60

<210> 5

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 5

cugaucaaug gcguaacaug gauucguucu cauaacccaaa acccuaacuc cuuggacugc 60

<210> 6

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 6

cugaucaaug gcguaacaug gauucguucu cauaacccaaa acccuaaccc cuuggacugu 60

<210> 7

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 7

uugacucaa uggcguaacaau ggauucguuc ucauaaccaa aaccuuacc ccuuggacug 60

<210> 8

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 8

uugaagaucg uacaauggau ucgaucauaa cccgaaguuu uuaacacuc uuuaccugua 60

<210> 9

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 9

ucgaguccac gaacauuaca uauuugaaca cuucagcacc gaacaugcuu aguacuaucc 60

<210> 10

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 10

uauuaccaua gccuugaggu aaacaauua gcacaccuga auacacgaac uaugaacuca 60

<210> 11

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 11

cuugagccaa uuaaaagauu uacaacaaga acaugaacgu gacagcgaua auaauacga 59

<210> 12

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 12

gcgacaagca gcagauaaag uugagcgcaa cgccgcuaca gaaccaaauu aacauguau 60

<210> 13

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 13

ucgaaaguua guccgauaca acacauaacc uauuauuuag cagcgauaau acaaauaag 59

<210> 14

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 14

gcaguaaucc acuuguaauu gaauguagau gccauauaga guuauuagua auccgaaug 60

<210> 15

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 15

cguaguagca caccaugacc uauuaaaucu gcuucgcaau guaccuuac acauaucag 60

<210> 16

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 16

gaaugacuaa uaauuacaac agauaaccuu acucuugaua aaugcuuugc uuuugguuua 60

<210> 17

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 17

ucuuucgaagu ccaugacugc aaaaccagau aguccuaauc ucaauuauc gucccaagua 60

<210> 18

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 18

acacucuaaa uugugguacu aaggagauaa gggcaacuac gaagacgugc aaggauaaag 60

<210> 19

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 19

uuugccucga cggucugcga auagaacgcg aaccgugauu aguguacaag gauucgguu 59

<210> 20

<211> 58

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 20

gucgcagcag aaauaucauc gcaaaaccuc aauugcaucu cauguauauc uaguccaa 58

<210> 21

<211> 57

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 21

cgaacaucug gaguaaucau cuuaauaacc ucauuuaccu uuacacuuuc uaaacua 57

<210> 22

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 22

ggguaagggu gagcaguuca agaugguaac ugcauucau uugaagaaag guugguagac 60

<210> 23

<211> 60

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 23

ggguaagggu gagcaguuca agaugguaac cggcauucau uugaagaaag guugguaac 60

<210> 24

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 24

cuugguguag uguucaagug agauauagua uaagguaauu guugugcgaa cgg 53

<210> 25

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 25

gggagaucag aauaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucucauaacc 60

aaaacccuuua ccccuuggac ugauucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 26

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 26

gggagauacag aaauaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucuauaacc 60

aaaacccuuua ccccuuggacu gauucgacau gaggccccug cagggcgc 107

<210> 27

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 27

gggagauacag aaauaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucuauaacc 60

aaaacccuuua ccccuuggac ugcuucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 28

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 28

gggagauacag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgc ucuauaacc 60
 aaaacccuuua ccccuuggac ugcuucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 29

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 29

gggagauacag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucuauaacc 60
 aaaacccuuua cuccuuggac ugcuucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 30

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 30

gggagauacag aauaaacgcu caacugauca auggcguaca auggauucgu ucuauaacc 60
 aaaacccuuua ccccuuggac ugguucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 31

<211> 108
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> protein bind
 <223> RNA aptamer
 <400> 31
 gggagauacag aauaaacgcu caauugacuc aauggcguac aauggauucg uucucauaac 60
 caaaaccuu accccuugga cuguucgaca ugaggccccu gcagggcgcg 108

<210> 32
 <211> 108
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> protein bind
 <223> RNA aptamer
 <400> 32
 gggagauacag aauaaacgcu caauugaaga ucguacaaug gauucgauca uaacctgaag 60
 uuuuuuaaca cucuuuaccu guauucgaca ugaggccccu gcagggcgcg 108

<210> 33
 <211> 108
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> protein bind
 <223> RNA aptamer
 <400> 33

gggagauacag aauaaacgcu caaucgaguc cacgaacauu acauauuuga acacuucagc 60
 accgaacaug cuuaguacua uccuucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 34

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 34

gggagauacag aauaaacgcu caauauuacc auagccuuga gguaaacaau uuagcacacc 60
 ugaauacacg aacuaugaac ucauucgaca ugaggccccu gcagggcgc 108

<210> 35

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 35

gggagauacag aauaaacgcu caacuugagc caauuaaaag auuuacaaca agaacaugaa 60
 cgugacagcg auaauaauc gauucgacau gagggccccug cagggcgc 107

<210> 36

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 36

gggagauacag aauaaacgcu caagcgacaa gcagcagaua aaguugagcg caacgcccgcu 60
 acagaaccaa auuaacaugu auguucgaca ugaggccccu gcagggcgcg 108

<210> 37

<211> 107

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 37

gggagauacag aauaaacgcu caaucgaaag uaaguccgau acaacacaua accuauuuau 60
 uagcagcgau aaucacaaaa aguucgacau gagggccccug cagggcgcg 107

<210> 38

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 38

gggagauacag aauaaacgcu caagcaguua uccacuugua auugaaugua gaugccauau 60
 agaguuaauua guaaucgaa uuguucgaca ugaggccccu gcagggcgcg 108

<210> 39

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 39

gggagauacag aauaaacgcu caacguagua gcacaccaug accuaauaaa ucugcuiucgc 60
aauguaccuu aacacauaau caguucgaca ugaggccccu gcagggcg 108

<210> 40

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 40

gggagauacag aauaaacgcu caagaaugac uaaaaauuac aacagauaac cuuacucuug 60
auaaaugcuu ugcuuuuggu uaauucgaca ugaggccccu gcagggcg 108

<210> 41

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 41
 gggagauacag aauaaacgcu caaucuucga aguccaugac ugcaaaacca gauaguccua 60
 aucucaaaua ucagucccaa guauucgaca ugaggcccu gcagggcg 108

<210> 42
 <211> 108
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> protein bind
 <223> RNA aptamer
 <400> 42
 gggagauacag aauaaacgcu caaacacucu aaauuguggu acuaagggag uaaggcaac 60
 uacgaagacg ugcaaggaua aaguucgaca ugaggcccu gcagggcg 108

<210> 43
 <211> 107
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> protein bind
 <223> RNA aptamer
 <400> 43
 gggagauacag aauaaacgcu cauuugccu cgacggucug cgaauagaac gcgaaccgug 60
 auuaguguac aaggauucgg uuuucgacau gaggcccu cagggcg 107

<210> 44
 <211> 106
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 44

gggagauacag aauaaacgcu caagucgcag cagaaaauac aucgcaaaac cucaauggca 60
 ucucauguau aucuagucca auucgacaug aggccccugc agggcg 106

<210> 45

<211> 105

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 45

gggagauacag aauaaacgcu caacgaacau cuggaguaau caucuuaua accucauuua 60
 ccuuuacacu uucuaaacua uucgacauga ggccccugca gggcg 105

<210> 46

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 46

gggagauacag aauaaacgcu caagguaag ggugagcagu ucaagauggu aacuggcauu 60
 cauuugaaga aagguauggua gacuucgaca ugaggcccu gcagggcg 108

<210> 47

<211> 108

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 47

gggagauacag aauaaacgcu caaggguaag ggugagcagu ucaagauggu aaccggcauu 60
 cauuugaaga aagguuggua aacuucgaca ugaggccccu gcagggcgcg 108

<210> 48

<211> 101

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 48

gggagauacag aauaaacgcu caacuuggug uagugucaa gugagauaua guauaaggua 60
 auuguugugc gaacgguucg acaugaggcc ccugcagggc g 101

<210> 49

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> prim transcript

<223> primer for cDNA

<400> 49

gggagauacag aauaaacgcu caa

23

<210> 50

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> prim transcript

<223> primer for cDNA

<400> 50

uucgacauga ggccccugca gggcg

25

<210> 51

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer bind

<223> PCR primer

<400> 51

gccggaattc taatacgact cactatagg agatcagaat aaacgctcaa

55

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer bind
 <223> PCR primer
 <400> 52
 cgccctgcag gggcctcatg tcgaa

25

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のインピトロセレクションにおける当初のRNAの配列とPCRプライマーの配列を示すものである。

【図2】

図2は、21回の処理におけるRNAプールから得られた24種のRNAの配列を示す。図中では、ランダム約60塩基の配列部分を示している。全体の配列は、図1で定義されている5'ー及び3'ー末端の配列を含んでいる。クローン1と同種の配列となっているものを「グループ1」としている。他のものを「グループ2」としている。

(注) a : 各々の単離されたリガンドのクローンの数をカッコ内に示した。

b : クローン21.08は、各々に定義された配列にそれぞれ2つの変異を有している。

c : RNAリガンドのGST-RBDへの結合のパーセントは、ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより測定した値に基づいている

。

【図3】

図3は、RNAリガンドのGST-RBD蛋白質への結合を示す。

RNAリガンドのGST-RBDへの結合のパーセントは、ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより測定した値に基づいている。

図3中の黒丸印は配列番号1のRNAを、黒四角印は配列番号7のRNAを、黒三角印は配列番号11のRNAを用いたものである。

【図4】

図4は、RNAアブタマーによる、RasとGST-RBDとの相互作用の阻

害を示す図面に代わる写真である。

抗Ras抗体RAS004によるイミュブロッティングより測定した、GST-RBDに結合したRas蛋白質の量を上段に示す。クマシーブルーでの染色によるGST-RBDの量を下段に示す。

GDP結合型(D)又はGTP γ S結合型(T)の2pmolのRas、及び25pmolのGST-RBDを、種々の量のRNAの存在下にインキュベートした。Aは21.01リガンド、Bは21.07リガンド、Cは21.11リガンド、Dは21.12リガンドを使用した。

【書類名】

図面

【図1】

Starting RNA:
5'-GGGAGAUCAGAAUAAACGCCUCAA [-60N-] UUCGACAUAGAGCCCCUGGCAGGGCCG-3'

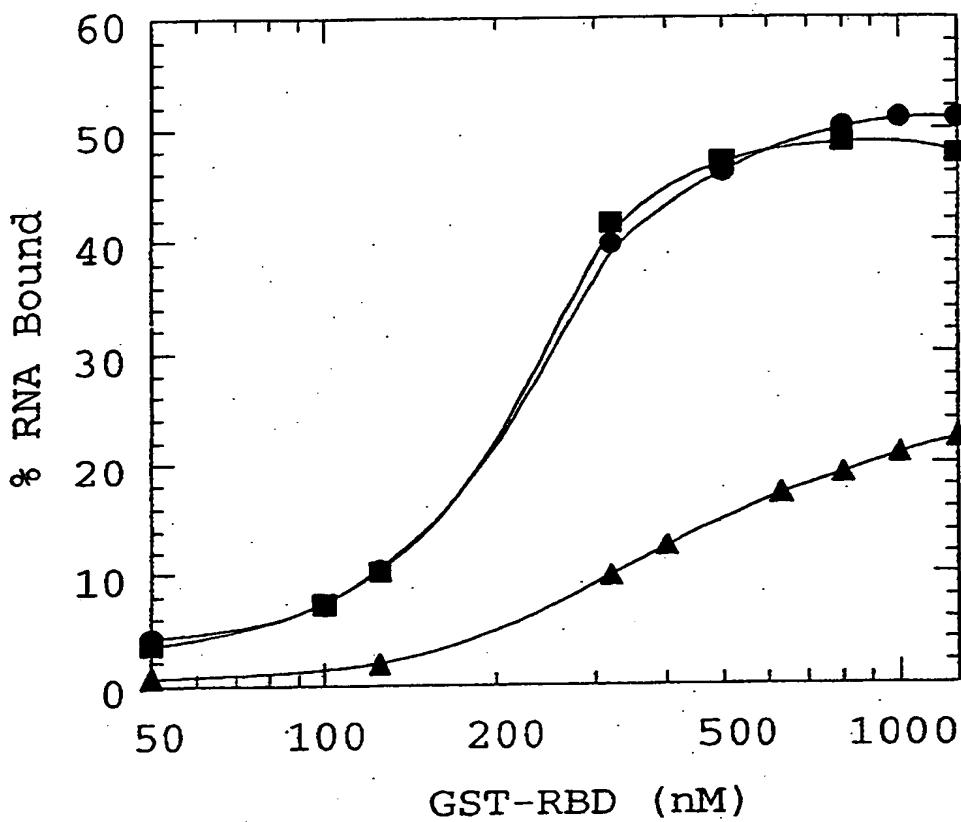
PCR primer 1:
5'-GCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGAGATCAGAATAAACGCTCAA-3'
ECORI T7 promoter

PCR primer 2:
5'-CGCCCTGCAGGGCCTCATGTCGAA-3'
PstII

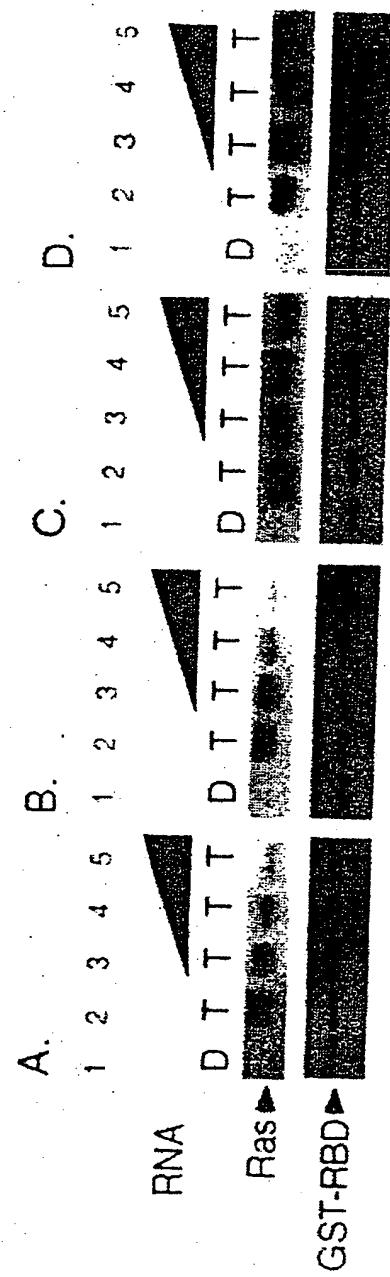
【図2】

| RNA clone ^a | Sequence ^b | RNA Bound (%) ^c |
|------------------------|---|----------------------------|
| Group 1 | 21.01 (6) CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACGCCUUGGACUGA | 42 |
| | 21.02 CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCC-UUGGACUGA | |
| | 21.03 (4) CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUGC | |
| | 21.04 CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUGC | |
| | 21.05 CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUGC | 46 |
| | 21.06 CUGAUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUGC | |
| | 21.07 UGACUCAAUGGGGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUG | 46 |
| | 21.08 UUGAGAGAUCGUACAUGGAUUCGUUCUCAUAACCAAAACCCUUACCCCUTGGACUGA | 12 |
| Group 2 | 21.09 UCGAGGUCCACGAAACAUUACAUUUGAACACUTUCAGGCCAACAGCUUAGUACUAUCC | |
| | 21.10 UAUUACCAUAGGCCUUGGGGUAAAACAUUUTUAGCACCCUGAUACAGGAACUAUGAACUCA | |
| | 21.11 (2) CUTUGAGGCCAUUAAAAGAUUUACAAACAAAGAACAGUAACUGAACGGCAGACGGACAGGAACUAUUAUACGA | 3 |
| | 21.12 GCGACAAGGCAGCAGGUAAAAGUTIGAGGCCAACGCCUACAGAACCAAAAUUAACAUUGAUG | 0.2 |
| | 21.13 UCGAAAGUAAGGUCCAUACACAUAAACCACAUAAACCACAUAAACCACAUAAUACAAUAAG | |
| | 21.14 GCAGGUAAUCCACUUTGUAAUUGUAAGUGUAAGGCCAUUAAAUCUGCUUACGUACCUUACAUAAUAG | |
| | 21.15 CGUAGUAGGCCACACCAUGGCCAUUAAAACCUUACUCUUGAUAAAUGCUTUGCUTUTUGGUAA | |
| | 21.16 GAAUGACUAAAUAUUAACAGAUAAAACCAGAUAGGUCCUAUUCUAAUUTAUCAGUCCAAG | |
| | 21.17 UCUUCGGAAGGUCCADUGACUGCAAACCAAGAUAGGUCCUAUUCUAAUUTAUCAGUCCAAG | |
| | 21.18 ACACUCUAAAUTUGGUACUAGGGGUAAAGGGCAACUAGAACCGUGAUUAGGUACAAAGGAUAAAG | 0.5 |
| | 21.19 UUUGCCUCGGACGGUCUGCGAUAGAACCGGAACCCUCAUTUGCAUCUCAUGUAAUUCGGUU | |
| | 21.20 GUCGCAGCAGAAAUAUCAUCGCAAACCUUACUCAUTUGCAUCUCAUGUAAUUCGGUU | 0.7 |
| | 21.21 CGAACACUUCUGGAGUAAUCAUCUUAUUAACCUUACCUUACUTUCUAAACUCA | |
| | 21.22 GGGUAAGGGUGAGGAGUUCAGAUUGGUACUGGUACUGGUUACGGCAUUCAUUTUGAAGGAAGGGGUAGAC | 1.3 |
| | 21.23 GGGUAAGGGUGAGGAGUUCAGAUUGGUACUGGUUACGGCAUUCAUUTUGAAGGAAGGGGUAAAC | |
| | 21.24 CTUGGUGUAGUGUUCAGUGAGAUUAAGGUUAUUGGUUAGUGUGGCGAACGG | |

【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、Ras蛋白質とRasの標的蛋白質が関与する細胞のシグナル伝達系を特異的に制御するための核酸を提供する。

【解決手段】 本発明は、Rasの標的蛋白質のRas結合ドメインに特異的に結合し得る核酸、好ましくはRNAに関する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

申請人

【識別番号】 100102668

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9

階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

THIS PAGE BLANK (USPTO)